

Title	Effect of Oxetanocin G, a Novel Nucleoside Analog, on DNA Synthesis by Hepatitis B Virus Virions
Author(s)	長幡, 武光
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39350
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について /a> をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	なが はた たけ みつ 長 幡 武 光
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 6 2 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 1 月 1 1 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Effect of Oxetanocin G, a Novel Nucleoside Analog, on DNA Synthesis by Hepatitis B Virus Virions (B型肝炎ウイルスビリオンによる DNA 合成に対する 新規核酸誘導体オキセタノシンGの作用)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松原 謙一 (副査) 教 授 島田 和典 教 授 田中亀代次

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

糖鎖としてオキセタン環を有するオキセタノシンAは *Bacillus megaterium* により産生され、抗B型肝炎ウイルス(HBV)活性を示す新規核酸である。このオキセタノシンAを化学的に修飾して得られた種々の誘導体の抗HBV活性を検討したところ、細胞毒性が弱く、最も強い抗HBV活性を示す誘導体としてオキセタノシンG(OXT-G)が発見された。OXT-Gは *in vitro* のみならず *in vivo* でも強い抗HBV活性を示し、優れた治療薬となる可能性が示唆された。そこで本研究では、OXT-Gがどのような作用機序をもってHBVの複製を阻害するのかを明らかにすることを目的として、HBVビリオンによるDNA合成に対するOXT-Gの作用を詳細に検討した。

(方法ならびに成績)

OXT-Gの *in vitro* 抗HBV活性

OXT-Gの *in vitro* 抗HBV活性はHBV産生肝癌細胞株HB611細胞を用いて測定した。HB611細胞を種々濃度のOXT-G存在下で15日間培養し、培養液の細胞から総DNAを抽出し、制限酵素HindⅢで完全消化した後、³²P標識HBV-DNAをプローブとしてサザンブロット法で解析した。細胞増殖阻害活性は対数増殖期のHB611細胞を用いてメチレンブルー染色法を用いて測定した。OXT-GがHBV-DNAの合成を50%阻害する濃度は1.5 μ Mであった。一方、細胞の増殖を50%阻害する濃度は1000 μ M以上であった。従って、OXT-GはHBVに特異的に作用し、細胞に対する作用は非常に弱いことが示された。

OXT-GのHBV-RNA合成に対する作用

HB611細胞を種々濃度のOXT-G存在下で6日間培養し、培養後の細胞からRNAを抽出し、³²P標識HBV-DNAをプローブとしてノザンブロット法で解析した。100 μ MのOXT-G存在下でも顕著なHBV-RNA合成阻害は認められなかった。従って、OXT-GはHBV-DNAを特異的に阻害するが、RNAに対してはほとんど作用しないことが示された。

OXT-G 三磷酸体による内在性 HBV-DNA ポリメラーゼの阻害

精製した HBV コア粒子を界面活性剤で処理し、種々濃度の OXT-G 三磷酸体存在下で内在性 HBV-DNA ポリメラーゼ反応を行い、HBV-DNA への ^{32}P 標識 dGTP の取り込みを解析した。OXT-G 三磷酸体が、内在性 HBV-DNA ポリメラーゼ反応を 50% 阻害する濃度は $1.5\ \mu\text{M}$ であった。また、 ^3H 標識 OXT-G 三磷酸体を用いて内在性 HBV-DNA ポリメラーゼ反応を行ったところ、OXT-G は HBV-DNA 鎖に取り込まれることがわかった。

OXT-G 三磷酸体による DNA ポリメラーゼ α の阻害

OXT-G の細胞 DNA ポリメラーゼに対する作用を知るために、内在性 HBV-DNA ポリメラーゼの阻害実験と同条件下で、DNA ポリメラーゼ α と活性化 DNA を用いて OXT-G の DNA ポリメラーゼ α に対する阻害活性を検討した。OXT-G 三磷酸体が DNA ポリメラーゼ α による DNA 合成を 50% 阻害する濃度は $10.3\ \mu\text{M}$ であった。従って、OXT-G 三磷酸体は DNA ポリメラーゼ α よりも HBV-DNA ポリメラーゼをより強く阻害することが示された。

OXT-G 三磷酸体の合成 DNA プライマー/テンプレートへの取り込み

合成 DNA プライマー/テンプレートと HIV 逆転写酵素、DNA ポリメラーゼ α 、Klenow 酵素を用いて ^3H 標識 OXT-G 三磷酸体の DNA 鎖への取り込みを検討した。その結果、OXT-G は同条件下の dGTP の取り込みと比較して、19.4%~34.6% 量が DNA 鎖に取り込まれた。また、合成 DNA プライマー/テンプレートに OXT-G が取り込まれて新たに生成した 3' 側末端には、次の塩基が取り込まれることがわかったが、その効率は OXT-G の代わりに dGTP が取り込まれたときの、4.9%~42.0% であった。

(総括)

本研究から、OXT-G の作用点は HBV-DNA ポリメラーゼであり、OXT-G は HBV-DNA 鎖に取り込まれ、OXT-G が取り込まれて新たに生成した 3' 側末端には次の塩基が取り込まれることがわかった。核酸誘導体抗ウイルス剤のアシクロビア、ジダノシン、シドブジンは DNA 鎖に効率よく取り込まれるが、新たに生成した 3' 側末端に次の塩基は取り込まれない。また、ガンシクロビア、BHCG は DNA 鎖に取り込まれ、新たに生成した 3' 側末端にも次の塩基が取り込まれる。OXT-G の抗ウイルス作用機序は後者のガンシクロビア、BHCG タイプであるが、OXT-G 自身が取り込まれる時が律速段階となってウイルス複製を阻害するものと考えられる。オキセタン環のような糖鎖を持つ核酸誘導体が、DNA 鎖に取り込まれ、さらに次の塩基が付加されることは今まで知られていなかったことであり、新たな核酸誘導体の作用機序が明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

B型肝炎ウイルス (HBV) は肝炎・肝癌発症に密接した重要な病原ウイルスであり、感染者は世界に3億人以上いると推定されている。本研究は HBV に対し高い抗ウイルス効果を示すオキセタノシン G (OXT-G) の作用機作を分子レベルで解析したものである。その結果、OXT-G の作用点は HBV-DNA ポリメラーゼであり、DNA 鎖に低効率で取り込まれること、さらに取り込まれた OXT-G の 3' 側には次の塩基が付加しうることが明らかとなった。

このような異常核酸が DNA 鎖に取り込まれて抗ウイルス活性を示すことは、今まで知られなかった事実であり、核酸誘導体の新たな作用機作の可能性を示唆した点で意義は大きい。

以上より、本論文は学位の授与に値すると認める。